

·基础研究·

重复经颅磁刺激叠加运动训练对脊髓损伤大鼠运动功能和神经元可塑性的影响*

殷睿安¹ 王双燕¹ 王 培¹ 许光旭^{2,3,5} 王红星^{4,5}

摘要

目的:观察重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)叠加运动训练对不完全性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠运动恢复和神经元可塑性的影响。

方法:60只大鼠随机分为假手术组(Sham组)、脊髓损伤对照组(SCI组)、单纯运动训练组(SCI-ET组)、先运动后rTMS组(SCI-ET+rTMS组)、先rTMS后运动组(SCI-rTMS+ET组)。Sham组仅进行T9水平椎板切除术,无SCI;SCI组建立脊髓挫伤模型,不进行训练干预;在SCI后,SCI-ET组仅进行跑台运动训练,SCI-ET+rTMS组每次在运动训练结束后立即进行rTMS,SCI-rTMS+ET组则在运动训练前进行rTMS。术前及术后采用BBB、神经电生理评价运动及神经元功能,并用Western Blot法检测脊髓(L2-4)处脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及synapsin I的蛋白表达。

结果:8周干预后,①与SCI组相比,SCI-ET+rTMS组($P<0.05$)和SCI-rTMS+ET组($P<0.01$)的BBB评分升高,F波波幅减小($P<0.05$),脊髓BDNF蛋白表达增高($P<0.01$),但仅SCI-rTMS+ET组synapsin I表达增高($P<0.01$);②与SCI-ET组相比,SCI-rTMS+ET组BBB评分和BDNF表达显著升高($P<0.05$)。

结论:rTMS叠加运动训练可显著提升不完全性SCI大鼠的后肢运动功能,通过诱导促进BDNF和synapsin I表达,改善中枢运动控制及运动神经元可塑性。

关键词 脊髓损伤;运动训练;重复经颅磁刺激;运动神经元;脑源性神经营养因子;synapsin I

中图分类号:R651.2;R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-07-0774-05

Effects of combined rTMS and exercise training on locomotor function and neuronal plasticity in rats with spinal cord injury/YIN Ruian, WANG Shuangyan, WANG Pei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(7): 774—778

Abstract

Objective: To investigate the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) combined with exercise training on locomotion recovery and neuronal plasticity in rats with incomplete spinal cord injury (SCI).

Method: Sixty rats were randomly divided into Sham operation group(Sham), spinal cord injury control group (SCI group), individual exercise training group(SCI-ET group), rTMS after exercise training group (SCI-ET+rTMS group), and rTMS before exercise training group(SCI-rTMS+ET group). In the Sham group, only T9 level laminectomy was performed without SCI. In the SCI group, spinal cord contusion model was established without treatment. After SCI, only treadmill training was performed in the SCI-ET group; rTMS was conducted immediately after treadmill training in the SCI-ET+rTMS group, while rTMS was conducted before treadmill training in the SCI-rTMS+ET group. BBB scale and neuroelectrophysiology test were performed to evaluate locomotor and neuronal function before and after the operation. After our intervention, Western Blot was used to detect

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.07.002

*基金项目:苏州市临床医学专家团队引进项目(SZYJTD201725);国家自然科学基金青年科学基金项目(81000853);江苏高校优势学科建设工程项目(JX10231801);江苏省卫生健康委员会江苏省青年医学人才项目(QNRC2016216);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2242020K40172)

1 南京医科大学,南京,210029; 2 南京医科大学附属江苏盛泽医院; 3 南京医科大学第一附属医院; 4 东南大学附属中大医院;

5 通讯作者

第一作者简介:殷睿安,女,硕士研究生; 收稿日期:2020-10-26

the expressions of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and synapsin I in lumbar spinal cord(L2—4).

Result: After 8-week-treatment, compared with the SCI group, BBB scores significantly enhanced in the SCI-ET+rTMS group ($P<0.05$) and SCI-rTMS+ET group ($P<0.01$), accompanied by decreased F wave amplitude ($P<0.05$) and increased BDNF protein expression ($P<0.01$). However, synapsin I protein increased only in the SCI-rTMS+ET group($P<0.01$). Specifically, BBB score and BDNF expression in the SCI-rTMS +ET group were significantly higher than those in the SCI-ET group ($P<0.05$).

Conclusion: rTMS combined with exercise training can enhance the hind limb locomotion of incomplete SCI rats, improve motor control of central nerve and motor neuron plasticity by promoting BDNF and synapsin I expression.

Author's address The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key word spinal cord injury; exercise training; repetitive transcranial magnetic stimulation; motor neurons; brain-derived neurotrophic factor; synapsin I

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后上行和下行纤维的传导中断,可造成损伤平面及以下的运动等功能障碍,严重影响患者生存质量^[1]。目前研究提示,运动训练和重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)对SCI运动功能恢复都有一定程度的促进作用^[2-3]。运动训练可通过增加神经营养因子等机制对SCI后神经可塑性产生广泛影响^[4],而rTMS则是一种高效的非侵入性神经调控技术,调节皮质及皮质下结构的神经电生理活动和特定神经网络突触效能^[5],可促进皮质脊髓神经的突触可塑性^[6]。

近期,非侵入性刺激和运动训练叠加治疗作为一种康复策略,逐渐在SCI的临床康复中应用^[7]。然而很少有研究关注rTMS叠加运动训练对SCI后运动恢复和神经元可塑性的影响,且在叠加治疗中两种方式干预的时间关系尚不清楚。有研究认为先进行rTMS训练可为随后的运动训练启动相应的功能网络^[8],而在运动训练诱导之后调节皮质兴奋性可进一步有选择地激活特定网络的活动依赖性可塑性,促进功能的稳定^[9]。因此,为取得SCI后更显著的运动功能改善,本研究将rTMS与运动训练叠加,旨在观察叠加治疗及其干预的时间顺序对不完全性SCI后运动功能恢复和远端脊髓神经元功能的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本实验采用健康雌性8周龄SPF级SD大鼠60只,体重200—220g,由南京医科大学动物实验中心

提供。动物饲养均采用标准饲料、自由饮水,12h明暗交替,室温22℃。所有操作均遵循实验动物使用指南,并经南京医科大学动物伦理委员会批准(IA-CUC-1901039)。

将SD大鼠随机分为5组,假手术组(Sham)、脊髓损伤对照组(SCI)、单纯运动训练组(SCI-ET)、先运动后刺激组(SCI-ET+rTMS)、先刺激后运动组(SCI-rTMS+ET),每组12只。①Sham组大鼠在T9椎体行椎板切除术,不进行SCI;②SCI组行椎板切除后,建立T9平面中度脊髓挫伤模型,但不进行训练干预;③SCI-ET组在SCI后仅进行跑台运动训练;④SCI-ET+rTMS组进行SCI造模,每次在运动训练结束后立即进行rTMS;⑤SCI-rTMS+ET组在SCI后,每次在rTMS结束后立即行运动训练。所有训练干预均在SCI后1周开始,每周训练5天,1天1次,持续8周。

1.2 脊髓损伤模型

采用Louisville损伤系统装置(Louisville injury system apparatus, LISA)撞击器进行T9椎体水平的脊髓挫伤。大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3.5ml/kg),缩爪反射消失后剃毛,无菌条件下在T9椎体附近背部皮肤划开约3cm的切口,分离筋膜及肌肉组织,暴露T9椎体并固定,切除椎板,暴露的脊髓置于仪器正下方,打击深度为1.2mm。打击后尾巴立即出现痉挛性摆动,大鼠苏醒后双后肢弛缓性瘫痪,表明造模成功。Sham组只暴露脊髓不进行打击,其余操作均相同。逐层缝合后,将大鼠置于温控垫上直至苏醒。术后每天至少两次腹部按摩排尿,直至大鼠自主排尿重建。

1.3 运动训练

SCI-ET、SCI-ET+rTMS 和 SCI-rTMS+ET 组在术后 1w 开始进行跑台运动训练。大鼠后肢固定于踏板上,躯干稳定于固定器上。每次训练 15min,根据功能恢复情况,跑台速度在第一周内从 60r/min (3.6m/min)逐渐提升至 100r/min(6m/min)并保持至干预流程结束。

1.4 重复经颅磁刺激

SCI-ET+rTMS 和 SCI-rTMS+ET 组大鼠在清醒状态下接受 rTMS 干预,躯干通过弹力绷带固定于平台上并保持头部稳定。采用直径为 6cm 的动物线圈(武汉依瑞德)刺激前囟,并与颅骨相切。rTMS 刺激频率为 10Hz,强度为最大输出(3T)的 30%,刺激 5s,间歇 25s,共 1000 个脉冲,总治疗时间为 10min。

1.5 BBB(Basso, Beattie, and Bresnahan)评分

运动功能采用 BBB 量表于术前及术后每一周进行评估,直至训练结束,由两位非实验人员独立评测。大鼠置于直径为 90cm 的圆形开放透明平台中,记录自由活动 4min 的情况,观察其后肢的移动、协调性、躯干稳定性、足趾廓清和尾巴的位置等。

1.6 F 波

大鼠在非麻醉状态下于术前及术后 1w、5w、9w 检测腓肠肌 F 波。将刺激电极插入坐骨神经出口处,参考电极置于脊椎皮肤;记录电极置于同侧腓肠肌中上部肌腹,相应参考电极置于足趾背侧皮肤;接地电极置于记录电极和刺激电极之间的皮下。连续超强刺激 20 次,获得 F 波,记录下 F 波波幅。

1.7 Western Blot

训练结束且相关评估完成后,腹腔深度麻醉大鼠,迅速分离腰膨大(L2—4)处组织,加入 RIPA 裂解液,匀浆、重悬后离心 20min,取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液混匀,100℃煮 10min。取 20μg 蛋白样品电泳分离,转至 PVDF 膜,于含 5%脱脂牛奶的 TBST 中室温封闭 1—2h 后,一抗孵育:BDNF (1:1000, Abcam)、synapsin I (1:6000, Abcam)和 GAPDH (1:1000, Proteintech),4℃过夜。次日 TBST 漂洗并孵育二抗 1h,再次洗膜,ECL 法显影条带。使用 Image J 软件分析灰度值,并用目的条带与 GAPDH 条带灰度值之比表示蛋白相对表达量。

1.8 统计学分析

实验数据均以均数±标准差表示,使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,BBB 评分和 F 波波幅结果采用重复测量方差分析。采用单因素方差分析比较脊髓内各指标的相对表达量后,使用 Turkey 检验进行两两比较。 $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 BBB 评分

BBB 评分在时间主效应上存在差异($F=857.774$, $P<0.001$),组别主效应也存在差异($F=1.753$, $P<0.05$),时间和组别之间有交互作用($F=2.748$, $P<0.05$)。术后第 7 周至第 9 周,SCI-rTMS+ET 组评分均显著高于 SCI 组(7w: $P<0.05$, 8w: $P<0.01$, 9w: $P<0.01$),且在第 9 周时明显高于 SCI-ET 组($P<0.05$)。SCI-ET+rTMS 组的评分在术后第 9 周显著高于 SCI 组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 量表评分变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$, 分)

干预时间	Sham	SCI	SCI-ET	SCI-ET+rTMS	SCI-rTMS+ET
0	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
1d	21.00±0.00	0.25±0.53	0.21±0.42	0.25±0.61	0.25±0.53
1w	21.00±0.00	6.71±2.58	7.00±2.93	6.87±2.95	6.46±2.83
2w	21.00±0.00	10.50±2.96	10.67±2.81	11.29±3.42	11.21±2.80
3w	21.00±0.00	11.54±3.12	11.88±2.40	12.63±2.78	12.79±2.76
4w	21.00±0.00	12.42±3.30	12.79±2.41	13.71±1.97	14.00±2.80
5w	21.00±0.00	13.00±3.31	13.50±2.43	14.37±1.56	14.75±2.56
6w	21.00±0.00	13.54±3.09	13.96±2.33	15.08±1.95	15.46±2.41
7w	21.00±0.00	13.75±2.91	14.29±2.07	15.46±1.47	15.79±2.17 ^①
8w	21.00±0.00	14.00±2.90	14.54±2.17	15.79±1.62	16.21±2.48 ^②
9w	21.00±0.00	14.08±2.84	14.71±2.07	16.08±1.59 ^①	16.50±2.00 ^{②③}

注:与 SCI 组相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 SCI-ET 组相比,③ $P<0.05$

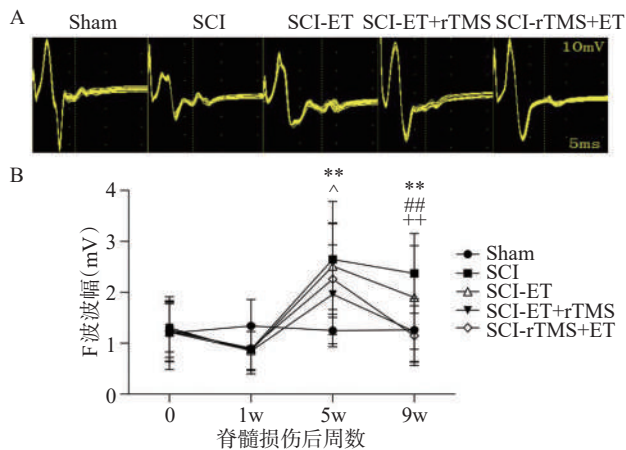
2.2 F 波波幅

重复测量方差分析显示,5 组大鼠 F 波平均波幅在时间主效应上差异有显著性意义($F=39.934$, $P<0.001$),组别主效应上也存在差异($F=4.510$, $P<0.001$),时间和组别之间有交互作用($F=5.188$, $P<0.01$)。术后第 1 周,接受 SCI 手术组的 4 组大鼠 F 波平均波幅较 Sham 组下降,4 周后波幅上升,且 SCI 组($P<0.01$)和 SCI-ET 组($P<0.05$)显著高于 Sham 组。术后第 9 周,SCI-ET+rTMS 组和 SCI-rTMS+ET 组波幅下降,明显低于 SCI 组,差异有显著性意义($P<0.01$)。见图 1。

2.3 Western Blot 结果

BDNF 蛋白表达显示,与 SCI 组相比,SCI-ET 组

图1 各组大鼠F波平均波幅变化



注:(A)术后9w各组的F波波形图;(B)术前及术后F波平均波幅的变化: ** $P<0.01$, SCI vs. Sham; ^ $P<0.05$, SCI+ET vs. Sham; ## $P<0.01$, SCI-ET+rTMS vs. SCI; ++ $P<0.01$, SCI-rTMS+ET vs. SCI

($P<0.05$)、SCI-ET+rTMS组($P<0.001$)和SCI-rTMS+ET组($P<0.001$)明显增加;SCI-rTMS+ET组表达与SCI-ET组相比也有增加,差异有显著性意义($P<0.05$)。Synapsin I表达显示,仅SCI-rTMS+ET组表达量显著高于SCI组($P<0.01$)。见图2。

3 讨论

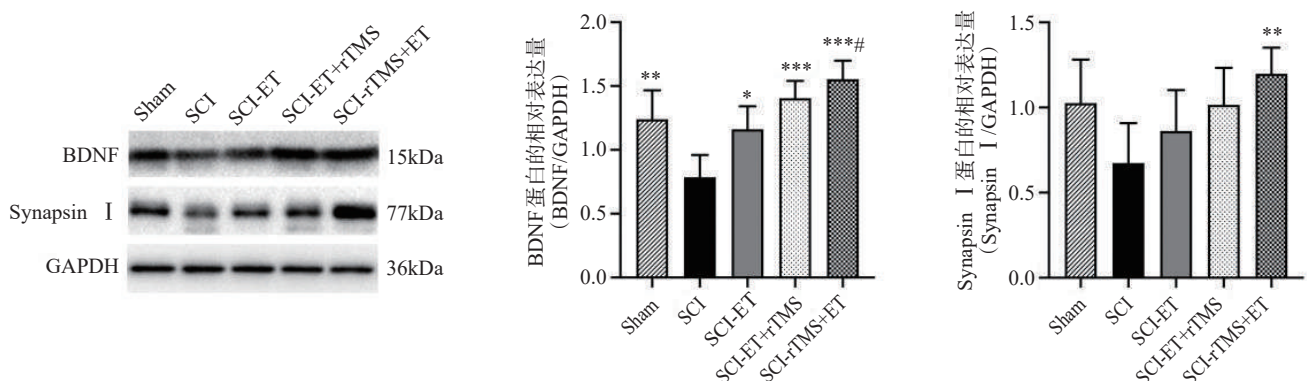
近期,运动训练结合无创神经调控技术作为一种康复策略被提出,以改善中枢神经系统损伤引起的运动功能障碍^[7,10]。为验证rTMS与运动训练叠加治疗对SCI后运动功能恢复的作用,本研究建立不完全性胸髓损伤的大鼠模型,并比较在运动训练前后进行rTMS治疗的差异。经8周干预后我们发现,

单一的运动训练对SCI后运动表现的提高有限。Yang等^[11]认为,大量单纯的运动训练可能不足以使功能障碍正常化,而训练结合rTMS可能对突触和神经网络可塑性产生协同效应。我们也一致发现8周的叠加治疗后,SCI大鼠的运动表现显著提高,一方面运动训练可增加多种神经营养因子,诱导活动依赖性可塑性^[12],另一方面,高频rTMS刺激运动皮质及皮质脊髓结构,有助于形成利于神经可塑性的内部环境,两者的叠加可能引起互补和累积效应^[5],诱导脊髓神经元和突触的可塑性,进一步促进运动功能的改善。

F波是运动神经纤维远端电刺激后运动神经元逆向激活而产生的电生理现象^[13-14],反映脊髓运动神经元池的兴奋性^[13,15]。SCI后,上位中枢控制功能失调^[6],导致运动神经元过度兴奋,使F波波幅增加^[13]。在本研究干预中期,经过SCI的4组均有不同程度的运动神经元兴奋性增高;在干预结束后,未经干预的SCI大鼠神经元兴奋性仍显著高于正常,而接受叠加治疗的兴奋性则逐渐降低。提示叠加治疗可改善上位中枢的控制障碍,调节脊髓上下运动神经元兴奋性的平衡,促进肌肉的协调收缩和功能恢复。

SCI发生后,脊髓神经元营养失衡^[17],细胞特性和突触关系发生变化^[18]。rTMS与运动叠加训练后,腰髓前角内BDNF含量显著增加。BDNF被认为可促进SCI后神元的存活、增殖和轴突再生^[17,19],而其含量的显著增加,说明叠加治疗可能更有效地促进远端脊髓的神经营养支持,改善神经再生的微环

图2 各组大鼠腰髓前角BDNF、synapsin I蛋白表达比较



注:与SCI组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与SCI+ET组相比,# $P<0.05$

境。另一方面,腰髓内高水平的BDNF与运动神经元池下行驱动增加、运动神经元特性的正常化和运动恢复改善有关^[18]。先前的研究表明,运动训练可提高BDNF的表达^[2],而高频rTMS可提高BDNF与其下行受体的亲和力^[20]。另外,Hou等^[21]发现,跑台训练与磁刺激相结合可显著上调SCI后大鼠腰髓内BDNF的表达,两种治疗方法的有效结合互补显著改善了SCI后的痉挛状态。因此我们推测,rTMS与运动叠加训练通过增加BDNF的含量,改善了SCI后的神经营养环境的同时,可能部分恢复了上位中枢对远端运动神经元的控制,诱导运动神经元功能的正常化并逐渐恢复对肌肉活动的控制。

本研究发现,与单独运动训练相比,先刺激治疗显著增加了腰髓BDNF的表达,并且更早地出现运动功能改善,而此现象在后进行rTMS的叠加治疗组并未观察到。此外,仅先进行rTMS治疗的大鼠腰髓前角内发生synapsin I蛋白的显著增加,而后刺激治疗与单纯运动治疗都未增加synapsin I水平。Fernando等^[22]也发现运动不能稳定地提高突触水平,而先进行rTMS可为随后的活动依赖性可塑性预先启动特定运动网络^[8]。此外,作为BDNF重要的下游效应因子^[23],synapsin I可被BDNF磷酸化,介导突触小泡循环和神经递质释放^[24],促进轴突形成和生长以及突触的发生,并在成熟的神经元中高表达^[24]。与运动评分较为一致的变化表明,脊髓神经元的突触连接增加可能支持运动的恢复。因此,先rTMS叠加运动训练可能通过靶向调节脊髓营养环境,最大程度地促进SCI后脊髓神经元的细胞特性及其可塑性,这些神经元发挥重要的突触调控作用,促进了神经调控过程的正常化,从而显著提高SCI大鼠的运动功能表现。

综上所述,rTMS与运动训练叠加治疗是一种有效的康复策略,可能通过增加神经营养因子并促进神经元细胞特性的恢复等机制对SCI后的运动功能恢复产生协同治疗作用,增加上位中枢对脊髓神经元及肌肉活动的控制。其中,在运动训练前进行rTMS在促进SCI后突触形成方面可能效果更佳,与干预时间顺序相关的突触可塑性变化的机制还需进一步的研究探讨。

4 结论

rTMS与运动训练叠加治疗可提高BDNF的表达,改善上位中枢的运动控制及运动神经元可塑性,促进SCI后的运动功能恢复。其中,在运动训练前进行rTMS对促进突触可塑性效果最佳。

参考文献

- [1] Urbin MA, Royston DA, Weber DJ, et al. What is the functional relevance of reorganization in primary motor cortex after spinal cord injury? [J]. Neurobiol Dis, 2019, 121: 286—295.
- [2] Fu J, Wang H, Deng L, et al. Exercise training promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. Neural Plast, 2016, 2016:4039580.
- [3] Leszczynska K, Wincek A, Fortuna W, et al. Treatment of patients with cervical and upper thoracic incomplete spinal cord injury using repetitive transcranial magnetic stimulation [J]. Int J Artif Organs, 2020, 43(5):323—331.
- [4] Sandrow-Feinberg HR, Houle JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation [J]. Brain Res, 2015, 1619:12—21.
- [5] Hendrikse J, Kandola A, Coxon J, et al. Combining aerobic exercise and repetitive transcranial magnetic stimulation to improve brain function in health and disease [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 83:11—20.
- [6] Bunday KL, Urbin MA, Perez MA. Potentiating paired corticospinal-motoneuronal plasticity after spinal cord injury [J]. Brain Stimul, 2018, 11(5):1083—1092.
- [7] James ND, McMahon SB, Field-Fote EC, et al. Neuromodulation in the restoration of function after spinal cord injury [J]. Lancet Neurol, 2018, 17(10):905—917.
- [8] Avenanti A, Coccia M, Ladavas E, et al. Low-frequency rTMS promotes use-dependent motor plasticity in chronic stroke: a randomized trial [J]. Neurology, 2012, 78(4):256—264.
- [9] Bolognini N, Pascual-Leone A, Fregni F. Using non-invasive brain stimulation to augment motor training-induced plasticity [J]. J Neuroeng Rehabil, 2009, 6:8.
- [10] Banerjee J, Sorrell ME, Celnik PA, et al. Immediate effects of repetitive magnetic stimulation on single cortical pyramidal neurons [J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0170528.
- [11] Yang YW, Pan WX, Xie Q. Combined effect of repetitive transcranial magnetic stimulation and physical exercise on cortical plasticity [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(11): 1986—1994.
- [12] Dunlop SA. Activity-dependent plasticity: implications for

(下转第792页)